

IAP20 Rec'd PCT/PTO 30 MAR 2006

Verfahren zur Methylierungsanalyse von DNA**Hintergrund der Erfindung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungen in DNA. 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryontischer Zellen. 5-Methylcytosin tritt nur im Sequenzkontext von CG-Dinukleotiden auf, wobei in der Regel die Cytosine in beiden DNA-Strängen methyliert sind. Die spezifischen Methylierungsmuster der DNA bleiben auch während einer DNA-Replikation erhalten. Dabei werden zunächst zwei hemimethylierte DNA-Doppelstränge gebildet, die anschließend in die vollmethylierte Form überführt werden. Diese Umwandlung erfolgt mit Hilfe von spezifischen „Erhaltungs“- (maintenance)-Methyltransferasen, etwa DNMT1. Diese Enzyme erkennen spezifisch hemimethylierte CG-Positionen und methylieren diese mit Hilfe eines Methylgruppendonors, meist S-Adenosyl-L-Methionin. Die Reaktionsmechanismen von Erhaltungs-Methyltransferasen sind ausführlich beschrieben (siehe etwa für DNMT1 Pradhan et al.: Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. J Biol Chem. 1999 Nov 12;274(46):33002-10).

Die Cytosinmethylierung spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: S. Beck and A. Olek, eds.: The Epigenome. Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig,

da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE 101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff; Fraga and Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. Biotechniques 33:632-649, Sept. 2002).

Wegen der Beteiligung der Cytosin-Methylierung in der Krankheitsentstehung, insbesondere in der Tumorgenese, sind diagnostische Anwendungen der Methylierungsanalyse von großem Interesse. Eine besondere Rolle spielen dabei Methoden, die es erlauben, abweichende Methylierungsmuster in Körperflüssigkeiten, etwa in Serum, nachzuweisen. Denn anders als die instabile RNA ist DNA oft in Körperflüssigkeiten anzutreffen. Bei destruktiven pathologischen Prozessen wie Krebserkrankungen ist die DNA-Konzentration im Blut sogar erhöht. Eine Krebsdiagnostik über eine Methylierungsanalyse von in Körperflüssigkeiten befindlicher Tumor-DNA ist also möglich und schon mehrfach beschrieben (siehe etwa: Palmisano et al.: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. Cancer Res. 2000 Nov 1;60(21):5954-8). Eine Schwierigkeit besteht jedoch darin, dass sich in den

Körperflüssigkeiten neben der DNA mit dem krankheitstypischen Methylierungsmuster eine große Menge an DNA der gleichen Sequenz aber eines anderen Methylierungsmusters befindet. Die Diagnoseverfahren stehen daher vor dem Problem, sehr geringe Mengen besonders methylierter DNA vor einem starken Hintergrund an DNA derselben Sequenz, aber eines anderen Methylierungsmusters, nachweisen zu müssen. Die Anwendbarkeit dieser Verfahren ist daher bisher begrenzt.

10

Es wurde nun ein Weg gefunden, wie die Menge der methylierten DNA vor der Analyse erhöht werden kann. Hierdurch wird ein sensitiverer Nachweis von Cytosinmethylierungen und somit eine frühere Diagnose von Krankheiten ermöglicht.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren arbeitet nach folgendem Prinzip: In der zu untersuchenden Probe befindet sich eine geringe Menge spezifisch methylierter DNA. Außerdem ist eine große Menge an Hintergrund-DNA vorhanden, bei der die entsprechenden Cytosinpositionen unmethyliert vorliegt. Die DNA-Doppelstränge werden getrennt und anschließend neu zusammengefügt. Dabei bilden sich Hybridmoleküle aus methylierter und unmethylierter DNA. Diese Hybride dienen als Substrat für eine Erhaltungsmethyltransferase. Die hemimethylierten Positionen werden so in vollmethylierte Positionen umgewandelt. Die Menge an methylierter DNA hat sich im optimalen Fall verdoppelt. Durch Wiederholung des Verfahrens lässt sich der Anteil der methylierter DNA weiter erhöhen.

30

Ein ähnliches Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen ist in der Patentanmeldung DE 102 14 232 offenbart. Beschrieben ist dort eine Methode zu einer methylierungserhaltenden PCR. Auch hierin wird die zu untersuchende methylierte DNA in hemimethylierte DNA überführt,

35

die anschließend mit Hilfe von Erhaltungs-Methyltransferasen in vollmethylierte DNA umgewandelt wird. Jedoch wird die hemimethylierte DNA in DE 102 14 232 durch Verlängerung eines an die zu untersuchende DNA hybridisierten Primer gebildet. Das erfindungsgemäße Verfahren dagegen benutzt zur Hybridbildung allein die in der Probe vorhandene DNA. Der Einsatz von Primern ist daher nicht erforderlich.

Beschreibung

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht einen sensitiven Nachweis methylierter DNA vor einem Hintergrund unmethylierter DNA. Das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt in folgenden Schritten:

- a) die zu untersuchten DNA-Doppelstränge werden getrennt und anschließend unter Bildung hemimethylierter Doppelstränge reassoziert,
- b) die in Schritt a) entstandenen hemimethylierten Positionen werden mit Hilfe eines Enzyms in vollmethylierte Positionen umgewandelt,
- c) die methylierte DNA wird analysiert.

Die Begriffe *methyliert*, *unmethyliert*, *hemimethyliert* und *vollmethyliert* beschreiben dabei nicht den Gesamt-Methylierungszustand der DNA, sondern nur den Zustand an den einzelnen zu untersuchenden CpG-Positionen innerhalb der DNA. Methyliert und vollmethyliert beschreiben synonym den Fall, in dem die zu untersuchenden Positionen in beiden DNA-Strängen methyliert sind. Unter *Hintergrund-DNA* wird im folgende unmethylierte DNA verstanden, die über die gleiche Basensequenz wie die zu untersuchende methylierte DNA verfügt.

In der zu untersuchenden Probe muss die methylierte DNA vor einem Hintergrund unmethylierter DNA vorliegen. So ist gewährleistet, dass nach der Trennung und Reassoziierung der DNA hemimethylierte Doppelstränge gebildet werden, die anschließend in vollmethylierte DNA transferiert werden können. Bevorzugt ist die Menge an Hintergrund DNA mindestens um den Faktor 20, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 50 höher als die Menge der methylierten DNA. Die zu untersuchende DNA kann je nach diagnostischer oder wissenschaftlicher Fragestellung aus unterschiedlichen Quellen stammen. Für diagnostische Untersuchungen können als Ausgangsmaterial insbesondere Körperflüssigkeiten dienen, da in diesen neben der nachzuweisenden methylierten DNA ein großer Hintergrund an unmethylierter DNA vorhanden ist. Bevorzugt wird Serum verwendet. Es ist aber u.a. auch möglich, die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit zu verwenden. Bevorzugt wird die DNA aus den biologischen Proben isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Standardmethoden, aus Blut etwa unter Verwendung des Qiagen UltraSens-DNA-Extraktions-Kits. Dem Fachmann sind weitere Verfahren zur DNA-Isolierung bekannt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird fragmentierte DNA verwendet. Die Trennung und Reassoziierung der DNA-Stränge kann so erleichtert erfolgen. Bevorzugt ist dabei eine Fragmentlänge von 0,2 bis 8 kB. Die Fragmentierung kann etwa durch Umsatz mit Restriktionsenzymen erfolgen. Die Reaktionsbedingungen und die in Frage kommenden Enzyme gehören zum Stand der Technik und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen. Dem Fachmann sind weitere Verfahren zur Fragmentierung von DNA bekannt. Insbesondere in Plasma-Proben liegt die DNA bereits in fragmentierter Form vor. Eine weitere Fragmentierung ist hier nicht erforderlich.

Die Trennung und Reassoziierung der DNA erfolgt bevorzugt durch Temperaturveränderungen. Gleichwohl ist auch die Verwendung anderer Techniken zur Erzeugung einzelsträngiger DNA bzw. zur Zusammenführung der Einzelstränge denkbar.

Die enzymatische Überführung der hemimethylierten in vollmethylierte DNA erfolgt bevorzugt unter Einsatz einer Erhaltungsmethyltransferase und eines Methylgruppendonors, etwa S-Adenosyl-Methionin. Als Enzym wird bevorzugt DNMT1 verwendet. Die Reaktionsbedingungen von DNMT1 gehören zum Stand der Technik und ergeben sich etwa aus den Protokollen kommerzieller Anbieter. Dem Fachmann ist bekannt, dass auch andere Enzyme eingesetzt werden können, die in der Lage sind, hemimethylierte Positionen in vollmethylierte Positionen zu überführen.

Im optimalen Fall lässt sich durch Trennung, Reassoziierung und Enzym-Umwandlung die Menge an methylierter DNA verdoppeln. Durch Wiederholung dieses Zyklus lässt sich eine weitere Erhöhung des methylierten DNA-Anteils erreichen. Wie oft diese Zyklen sinnvollerweise durchgeführt werden, hängt von dem Verhältnis zwischen methylierter DNA und Hintergrund-DNA ab. Eine optimale Zyklenzahl ist leicht experimentell zu bestimmen.

Bei wiederholten Zyklen muss darauf geachtet werden, dass eine thermische Trennung der Doppelstränge zu einer Denaturierung der Methyltransferase führen kann. In diesem Fall muss das Enzym in jedem Zyklus neu hinzugegeben werden. Steht eine thermostabile Enzymvariante zur Verfügung, so ist eine wiederholte Zugabe jedoch nicht erforderlich.

Im letzten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die methylierte DNA analysiert. Hierzu ist dem Fachmann

eine Vielzahl von Methoden bekannt (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff; Fraga and Esteller a.a.o.). Bevorzugt wird die DNA zunächst mit einem Bisulfitreagenz umgesetzt, das nicht-methyliertes Cytosin in Uracil überführt, 5-Methylcytosin aber unverändert läßt (siehe etwa: 5
DE 101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Eine entsprechende Konversion ist auch durch Einsatz methylierungsspezifischer Cytidin-Deaminasen denkbar (vgl.: Bransteitter et al.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxy-
10 oxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Die umgewandelte DNA kann auf unterschiedliche Art und 15
Weise analysiert werden. Besonders bevorzugt ist es, die DNA zunächst mittels einer Polymerasekettenreaktion zu amplifizieren. Über unterschiedliche Verfahren läßt sich dabei eine selektive Amplifikation der methylierten DNA sicherstellen, etwa über die sog. „Heavy-Methyl“-Methode
20 (zur Übersicht: WO 02/072880) oder die sog. „methylierungssensitive PCR“ („MSP“; vgl.: Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6). Die Detektion der Amplifikate
25 kann über herkömmliche Verfahren erfolgen, etwa über Primer-Extension-Reaktionen („MsSNuPE“; siehe etwa: DE 100 10 280) oder über Hybridisierung an Oligomer-Arrays (Siehe etwa: Adorjan et al., Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1;30(5):e21). In einer ande-
30 ren besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate unter Verwendung von PCR-Real-Time-Varianten analysiert (vgl.: US 6,331,393 „Methyl-Light“). Bevorzug-

te Varianten sind dabei das „Taqman“- und das „Lightcycler“-Verfahren).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung besteht in der Verwendung aller erfindungsgemäßen Ausführungsformen. Werden krankheitsspezifische Cytosinpositionen untersucht, so eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zur Diagnose oder Prognose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Festlegung einer spezifischen Arzneimitteltherapie (personalisierte Medizin) und zur Überwachung des Erfolges einer Arzneimitteltherapie. Eine weitere Anwendung ist die Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben und die Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Der Fachmann erkennt, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch in der umgekehrten Richtung erfolgen kann, sofern Enzyme zur Verfügung stehen, die spezifisch hemimethylierte DNA in unmethylierte DNA umwandeln. Hiermit kann
5 eine geringe Menge unmethylierter DNA vor einem großen Hintergrund methylierter DNA nachgewiesen werden. Die zu untersuchenden DNA-Doppelstränge werden wie oben beschrieben zunächst getrennt und anschließend unter Bildung hemimethylierter Doppelstränge reassoziert. Die DNA wird
10 dann mit einem Enzym umgesetzt, das spezifisch die Methylgruppen an den hemimethylierten Positionen entfernt. Die Menge an unmethylierter DNA läßt sich so erhöhen. Die weitere Analyse kann wie oben beschrieben erfolgen.

15 Ausführungsbeispiel

Identifizierung methylierter GSTP1-Exon1-DNA im Plasma von Prostata-Tumor Patienten.

Die DNA wurde aus 1 ml Plasma mit dem QIAamp UltraSens
20 Virus Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. 50 µl der isolierten DNA (ca. 100 pg) wurden für 10 min bei 96 °C inkubiert und anschließend innerhalb von 60 min auf 25 °C abgekühlt. Die DNA-Lösung wurde dann mit 2 Units menschlicher DNA-(cytosine-5)-Methyltransferase
25 (Dnmt1) von New England Biolabs nach Herstellerangaben für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Inkubation für 10 min bei 96 °C. Anschließend wurde die Reaktionslösung wiederum innerhalb von 60 min auf 25 °C abgekühlt und nach Zugabe von 2 Units Dnmt1 für weitere 2
30 h bei 37 °C nach Herstellerangaben inkubiert. Im Anschluß wurde die DNA-Lösung einer Bisulfit-Behandlung unterzogen (Olek et al. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6). Durch diese Reaktion werden unmethylierte Cytosine in Uracile umgewandelt, wogegen methylierte Cytosine nicht
35 verändert werden.

Die methylierten GSTP1-Exon1-DNA-Fragmente wurden anschließend durch eine HeavyMethyl-Real-Time-PCR nachgewiesen. Hierzu wurde das GSTP1-Exon1-Fragment (nt 1183 to nt 1303 in Genbank Accession M24485.1) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in einem LightCycler Gerät (Roche Diagnostics) amplifiziert. Der Real-Time-PCR-Reaktionsmix bestand aus 10 µl DNA, 2 µl FastStart-LightCycler-Reaktions-Mix für Hybridisierungssonden (Roche Diagnostics, Penzberg), 0,30 µmol/l Primer (SEQ ID NO: 1; GGGAttAtttTTATAAGGtT), 0,30 µmol/l Primer (SEQ ID NO: 2; TaCTaaaAACTCTaAaCCCCATC), 0,15 µmol/l Fluorescein-Detektionssonde (SEQ ID NO: 3; TTCGtCGtCGtAGTtTTCGtt-fluorescein; TIB-MolBiol, Berlin), 0,15 µmol/l Detektionssonde (SEQ ID NO: 4; red640-tAGTGAGTACGCGCGGtt-phosphate; TIB-MolBiol, Berlin), 4 µmol/l Blocker-Oligonukleotid (SEQ ID NO: 5; CCCATCCCCaAAAACaCaAACCaCa-phosphat, TIB-MolBiol, Berlin) und 3,5 mmol/l MgCl₂. In den Oligonukleotidsequenzen wurden diejenigen Positionen, die den umgewandelten, ursprünglich nicht methylierten Cytosinen entsprechen, mit einem kleinen „t“ gekennzeichnet (bzw. kleines „a“ im komplementären Strang). Dagegen stehen das große „T“ (bzw. „A“ im komplementären Strang) für die bereits vor der Bisulfit-Behandlung vorhandenen Thyminer.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: eine Inkubation für 10 min bei 95 °C, anschließend 55 Zyklen mit folgenden Schritten: 95 °C für 10 s, 56°C für 30 s, und 72 °C für 10 s. Die Fluoreszenz wurde nach der Annealingphase bei 56 °C in jedem Zyklus gemessen.

Vergleichende GSTP1-PCRs von Dmmt1-behandelten und nicht-behandelten Proben zeigten, dass methylierte GSTP1 DNA-Fragmente in Dmmt1-behandelten Proben um 0,5-1,5 Zyklen

früher detektiert werden konnten. Dies entspricht einer Vermehrung der methylierten DNA um 50-150%.

Patentansprüche

- 1) Verfahren zum Nachweis methylierter DNA vor einem
5 Hintergrund unmethylierter DNA, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) die zu untersuchten DNA-Doppelstränge getrennt und anschließend unter Bildung hemimethylierter Doppelstränge reassoziert werden,
 - 10 b) die in Schritt a) entstandenen hemimethylierten Positionen mit Hilfe eines Enzyms in vollmethylierte Positionen umgewandelt werden,
 - c) die methylierte DNA analysiert wird.
- 15 2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass DNA aus Körperflüssigkeiten untersucht wird.
- 3) Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass DNA aus Serum untersucht wird.
20
- 4) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA vor Schritt a) fragmentiert wird.
- 25 5) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) eine Erhaltungs-Methyltransferase verwendet wird.
- 6) Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Erhaltungs-Methyltransferase DNMT1 verwendet wird.
30
- 7) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte a) und
35 b) einmal oder mehrfach wiederholt werden.

- 8) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine thermostabile Methyltransferase verwendet wird.
- 5 9) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet dass die DNA in Schritt c) zunächst mittels eines Bisulfitreagens oder enzymatisch umgewandelt wird.
- 10 10) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die umgewandelte DNA mittels einer der folgenden Methoden analysiert wird: MSP, Heavy Methyl, MsSNuPE, Methyl-Light.
- 15 11) Verwendung eines der Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Diagnose oder Prognose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Festlegung einer spezifischen Arzneimitteltherapie, zur Überwachung des Erfolges einer Arzneimitteltherapie, zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben und zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
- 20 12) Verfahren zum Nachweis unmethylierter DNA vor einem Hintergrund methylierter DNA, dadurch gekennzeichnet, dass
 - 25 a) die zu untersuchenden DNA-Doppelstränge getrennt und anschließend unter Bildung hemimethylierter Doppelstränge reassoziert werden,
 - 30 b) die in Schritt a) entstandenen hemimethylierten Positionen mit Hilfe eines Enzyms in unmethylierte Positionen umgewandelt werden,
 - 35 c) die unmethylierte DNA analysiert wird.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum
5 Nachweis methylierter DNA vor einem Hintergrund unmethylierter DNA. Dabei werden die zu untersuchenden DNA-Doppelstränge getrennt und anschließend unter Bildung hemimethylierter Doppelstränge reassoziert. Danach wird die hemimethylierte DNA enzymatisch in vollmethylierte
10 DNA umgewandelt. Die Menge an methylierter DNA wird so erhöht. Anschließend kann die methylierte DNA über unterschiedliche Verfahren analysiert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose und Prognose von Krebserkrankungen und anderer mit einer
15 Veränderung des Methylierungsstatus assoziierter Krankheiten sowie zur Vorhersage unerwünschter Arzneimittelwirkungen

10/573930
 AP20 Rec'd PCT/PTO 30 MAR 2006

Sequenzprotokoll

5 <110> Epigenomics AG
 <120> Verfahren zur Methylierungsanalyse von DNA
 <160> 5

10 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> primer1
 <400> 1

20 gggattatattt ttataaggtt 20
 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer2

30 <400> 2
 tactaaaaac tctaaacccc atc 23
 <210> 3
 35 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> detection probe1
 <400> 3

45 ttcgctcgtcg tagttttcgt t 21
 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> detection probe2
 <400> 4

55 tagtgagtac gcgcggtt 18
 <210> 5
 60 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> blocker

<400> 5

cccatcccca aaaacacaaa ccaca